ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Epicatechin on Survival of PC12 Neurons Exposed to Valproic Acid

Mohammad Shokrzadeh[1],
Abbas Mohammad pour[2],
Zahra Tajik[3],
Maryam Alizadeh[4],
Shaghayegh Aghajanshakeri[5]

[1] Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Sana University, Sari, Iran
[3] MSc Student in Genetics, Faculty of Pharmacy, Sana University, Sari, Iran
[4] MSc in Applied Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract

Background and purpose: It is well established that valproic acid (VPA) is teratogenic associated with oxidative stress in humans and in all animal species tested. In this study, considering the chemical composition of catechins, we investigated its protective effect on the survival of PC12 nerve cells exposed to valproic acid.

Materials and methods: The protective effects of epicatechin (EC) at different concentrations (10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml) on survival and viability of PC12 neuronal cells exposed to valproic acid were measured by MTT assay and oxidative stress tests (GPx, SOD, ROS, and lipid peroxidation). All data were analyzed in GraphPad Prism 8.0 using one-way ANOVA and Tukey post-test.

Results: According to findings, EC reduced the cytotoxic effects of valproic acid at 500 and 1000 µg/ml ($P<0.0001$). EC significantly reduced the oxidative stress induced by valproic acid via decreasing reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) production ($P<0.001$ and $P<0.0001$, respectively).

Conclusion: The present study showed that epicatechin could increase antioxidant potential and exhibits significant cytoprotective effect against valproic acid toxicity in PC12 cells.

***Keywords*:** oxidative stress, epicatechin, valproic acid, PC12

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (220): 31-42 (Persian).

Corresponding Author: Shaghayegh Aghajanshakeri - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره 220 اردیبهشت سال 1402 (42-31)

اثر حفاظتی اپی کاتچین بر زنده مانی سلول عصبی PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید

محمد شکرزاده[1]
عباس محمدپور[2]
زهرا تاجیک[3]
مریم علیزاده[4]
شقایق آقاجان شاکری[5]

چکیده

سابقه و هدف: به خوبی ثابت شده است که داروی ضد تشنج والپروئیک اسید با ایجاد استرس اکسیداتیو در انسان و در تمام گونه‌های حیوانی مورد آزمایش، تراتوژنیک است. در این مطالعه، باتوجه به ترکیب شیمیایی کاتچین‌ها، اثر محافظتی آن بر زنده مانی سلول‌های عصبی PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید بررسی شد.

مواد و روش‌ها: اثرات محافظتی اپی کاتچین (دوز 10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر سمیت ناشی از داروی والپروئیک اسید بر بقا و زنده مانی سلول عصبی PC12 توسط تست MTT و تست‌های استرس اکسیداتیو شامل (ارزیابی میزان ROS، SOD، GPx و پراکسیداسیون لیپیدی) بررسی شد. تمامی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه one-way ANOVA و تست Tukey توسط GraphPad Prism.8 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج، اپی کاتچین اثرات سیتوتوکسیک اسید والپروئیک را در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش داد($P<0/0001$). اپی کتچین به طور معنی‌داری استرس اکسیداتیو ناشی از والپروئیک اسید را از طریق کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مالون دی آلدهید (MDA) اعمال کرده است ($P<0/001$ و $P<0/0001$).

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که مصرف اپی‌کاتچین می‌تواند پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. هم‌چنین، EC محافظت سلولی قابل توجهی را در برابر سمیت اسید والپروئیک در سلول‌های PC12 نشان داد.

واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، اپی کاتچین، والپروئیک اسید، PC12

مقدمه

سدیم والپروات، یک داروی وسیع‌الطیف است و به عنوان یکی از داروهای رایج ضد تشنج مورد استفاده قرار می‌گیرد(1). والپروئیک اسید (VPA) یک زنجیره کوتاه از اسید چرب می‌باشد تا مدت‌های طولانی تصور بر این بود که مکانیسم عمل این دارو در ارتباط با مسیرهای انتقال دهنده‌های عصبی می‌باشد، اما شواهدی وجود دارد که نشان‌دهنده اثر این دارو بر روی رشد، تمایز و آپوپتوزیس سلول‌ها می‌باشد(2). اسید والپروئیک در

مولف مسئول: شقایق آقاجان شاکری - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی E-mail : Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com
1. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استادیار، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه غیر انتفاعی سنا، ساری، ایران
3. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی ژنتیک، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه غیر انتفاعی سنا، ساری، ایران
4. کارشناسی ارشد شیمی کاربردی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. دکترای تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1401/6/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/7/17 تاریخ تصویب : 1402/12/22

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

مدل‌های حیوانی باعث رشد زواید عصبی، بازآرایی آکسونی و نورون‌زایی در هیپوکامپ می‌شود(3). فرمولاسیون‌های متعدد این دارو، قابلیت جذب خوبی دارد و به پروتئین‌های پلاسما به میزان بالایی باند می‌شود. نیمه عمر آن بین 18-9 ساعت است و متابولیزه شدن آن در بدن وسیع می‌باشد. سدیم والپروات همانند سایر داروهای ضد تشنج، دارای عوارض دارویی است که این عوارض شامل عوارض گذرا و غیر خطرناک نظیر افزایش وزن، خواب آلودگی گذرا، ریزش مو، لرزش در حین فعالیت و استراحت، ترومبوسیتوپنی برگشت‌پذیر و افزایش متوسط تا حدود 3 برابری گاماگلوتامیل ترانسفراز و عوارض خطرناکی مانند هپاتوتوکسیسیتی، انسفالوپاتی، اختلالات انعقادی، پانکراتیت و سرکوب مغز استخوان می‌باشد(4). اثرات جانبی ناشی از مصرف دارو، یکی از علت‌های مهم جمع‌آوری دارو از بازار می‌باشد. از این جهت شناسایی اثرات جانبی دارو و مکانیسم‌های درگیر در آن اهمیت به‌سزایی دارد(5). صرع و داروهای ضد صرع در تشکیل رادیکال های آزاد نقش دارند، بنابراین می‌توانند منجر به استرس اکسیداتیو شوند(6). سیستم عصبی به دلیل فراوانی بالای اسیدهای چرب غیراشباع در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر و مستعد تشکیل لیپید پراکسیداسیون می‌باشد. بنابراین افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث تخریب نورون‌ها شود(7). امروزه شناخت، مدیریت و مهار سمیت عصبی مرتبط با دارو، به مسئله‌ی مهمی در انتخاب درمان تبدیل شده است. ترکیبات طبیعی مانند پلی‌فنل‌ها برای جلوگیری و درمان سمیت عصبی وابسته به دارو به‌کار می‌روند(8). مهم‌ترین فلاونوئید در چای فلاونول یا همان کاتچین‌ها (کتچین‌ها) می‌باشند(9). کاتچین‌ها دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و مفیدی در بدن می‌باشند و در چای سبز شش کاتچین موجود می‌باشد(10). اپی‌گالوکاتچین گالات، مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی برگ چای سبز است که از جمله مهم‌ترین گروه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است(11). اپی‌گالوکاتچین گالات مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی برگ چای سبز است که از جمله مهم‌ترین گروه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و بسیار ازخواص آنتی‌اکسیدانی چای سبز به آن نسبت داده می‌شود(12). هم‌چنین اثرات ضد التهاب و محافظت‌کننده عصبی دارد(13). کاتچین‌ها فلاونوئیدهای پلی‌فنولی مشتق شده از کاتچو هستند. چای سبز، یکی از پرمصرف‌ترین نوشیدنی‌ها در سراسر جهان که از جوانه‌ها و برگ‌های گیاه Camellia sinensis به‌دست می‌آید، منبع شناخته شده‌ای است. علاوه بر این، کاتچین‌ها در انواع غذاها و گیاهان از جمله شراب، سیب، خرمالو، کاکائو، انگور، انواع توت‌ها و محصولات مبتنی بر کاکائو یافت می‌شوند. با توجه به گروه‌های هیدروکسیل متعدد، کاتچین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کننده فلزی قوی هستند که در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی تأیید شده‌اند(14). برخی از کارها بر روی استفاده از کاتچین در اختلالات نورودژنراتیو متمرکز شده اند، به عنوان مثال، بیماری آلزایمر و بیماری پارکینسون از این دسته‌اند(15). استرس اکسیداتیو با فعال کردن آبشارهای سیگنالینگ درون سلولی که در آپوپتوز، خودایمنی خارج سلولی نقش دارند، نقش اصلی را در انحطاط نورون‌ها ایفا می‌کند(16). کاتچین به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با کاهش استرس اکسیداتیو، حذف ROS و بهبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسیب عصبی را کاهش می‌دهد(17). آسیب اکسیداتیو به مولکول‌های حیاتی در نهایت منجر به بروز بیماری‌های مزمن از قبیل بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت، آلزایمر، پارکینسون، آرتریت و ناباروری می‌شود. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و توانایی بدن برای سم‌زدایی آثار مخرب آن‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد(18). سلول‌های PC12 به عنوان مدلی مناسب برای مطالعه اثرات تمایزی فاکتورهای متعدد به‌کار می‌روند و به‌طورگسترده درسلول درمانی برای بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند(19). رده سلولی PC12 به عنوان یکی از انواع

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

سلول‌های چندتوانه به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی در طی سال‌های اخیر، مورد استفاده قرار گرفته است(20). از آن‌جایی‌که تاکنون اثرات حفاظتی اپی‌کاتچین بر زنده مانی سلول عصبی PC12 بررسی نشده، بنابراین در این مطالعه اثر حفاظتی اپی‌کاتچین بر زنده مانی سلول‌های عصبی PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

عصاره گیری کاتچین

برای استخراج عصاره از روش Bakhshi و Arakawa استفاده شد به این ترتیب که به 0/5گرم از پودر نمونه خشک شده چای به 3 میلی‌لیتر حلال استخراج شامل متانول و استیک اسید به نسبت (85 به 15) اضافه شد و به‌مدت24 ساعت در یخچال نگهداری شد پس از آن، لوله‌های آزمایش حاوی نمونه، در سانتریفیوژ مدل (14-1، شرکت Sigma، آلمان) قرار گرفتند و به‌مدت 10 دقیقه با سرعت 1000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند محلول رویی شناور که حاوی عصاره گیاه بود برای اندازه‌گیری میزان فنل، فلاونول، فلاونوئید، آنتوسیانین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با دقت توسط سمپلر جدا و در میکروتیوب ریخته شد(21).

تعیین مقدار کاتچین کل یا فلاونول

میزان فلاونول کل براساس رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و بر حسب روتین اندازه‌گیری شد. برای این منظور، به 1 میلی‌لیتر از عصاره، 2میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم 2 درصد، 6 میلی‌لیتر استات سدیم 5 درصد و 1 میلی‌لیتر حلال استخراج اضافه شد سپس، میزان جذب نمونه‌ها پس از 2/5 ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق در طول موج 445 نانومتر خوانده شد برای رسم نمودار استاندارد از روتین استفاده شد(22).

تعیین مقدار فنل کل

برای سنجش میزان فنل کل، معرف فولین دنیز–سیکالتو و استاندارد گالیک اسید استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک بیان شد به این ترتیب که به 125 میکرولیتر از عصاره، 375 میکرولیتر آب مقطر، 2/5 میلی لیتر فولین 10درصد و پس از 6 دقیقه 2 میلی لیتر محلول کربنات سدیم 7/5 درصد درتاریکی اضافه شد. پس از 1/5 ساعت قرار گرفتن در تاریکی جذب نمونه‌ها در طول موج 763 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل Ultrospec 3000 شرکت CamSpec، چین) خوانده شد(23).

تهیه داروی والپروئیک اسید

داروی والپروئیک اسید با خلوص بالا از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد.

کشت سلول

رده سلولی عصبی PC12 ، رده‌ای مشتق شده از فئوکروموسیتوم مدولای فوق کلیوی رت دارای منشا جنینی و تاج عصبی (مخلوطی از سلول‌های نوروبلاستیک و سلول‌های ائوزینوفیلیک) می‌باشد. رده سلولی ذکر شده در مطالعه حاضر، ازبانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک تهیه شد و استفاده گردید. سلول‌های PC12 در DMEM/High Glc سرم جنین بهمراه استرپتومایسین در انکوباتور در دمای 37/5 درجه سانتی‌گراد، 5 درصد CO_2 و رطوبت کافی نگهداری شدند و هر دو الی سه روز یک بار میزان رشد و عدم آلودگی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. زمانی که سلول‌ها به 70 درصد رشد خود رسیدند، سلول‌ها توسط تریپسین (EDTA) از ته فلاسک جدا و با دور 1500 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و رسوب سلولی(پلت) ایجادشده را به‌حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده ماندن سلول‌ها از رنگ تریپان بلو و لام همو سایتومر توسط میکروسکوپ نوری استفاده شد(23).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

ارزیابی سمیت سلولی تست MTT

بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. روش MTT یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که طی آن نمک تترازولیوم که محلول در آب است و زمانی که در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS آماده‌سازی می‌شود، محلول زردرنگی ایجاد می‌کند، توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال احیا شده و به کریستال‌های نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شوند. جذب نوری این کریستال‌ها پس از حل شدن در حلال DMSO توسط دستگاه الایزا ریدر قابل اندازه‌گیری است. هرچه میزان زنده بودن سلول‌ها پس از تیمار بیش‌تر باشد میزان جذب نوری که با دستگاه خوانده می‌شود بیش‌تر است، زیرا میزان رنگ ایجاد شده توسط سلول‌های زنده بیش‌تر است. 24 ساعت پس از کشت سلول‌های عصبی PC12، اپی‌کاتچین در غلظت‌های (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پس گذشت از 24 ساعت دیگر، داروی والپروئیک اسید در غلظت IC_{50} به سلول‌ها اضافه شدند. تست MTT 24 ساعت پس از مجموع افزودن اپی‌کتچین و والپروئیک اسید (Pre-treatment) صورت گرفت. جهت انجام تست MTT، به میزان 0/45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک به عنوان رفرنس در محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد، 10 میکرولیتر از نمک MTT به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شدند. پس از گذشت 4 ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد، محیط حاوی MTT نیز خارج شد و به هر خانه مقدار 150 میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از گذشت حدود 10 دقیقه میزان جذب کریستال‌های تشکیل شده توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج 570 نانومتر خوانده شد(24).

اندازه‌گیری میزان ROS

اندازه‌گیری ROS با فلوریمتری و با استفاده از معرف DCFH-DA انجام شد. 20 میکرولیتر DCFH-DA به 2000 میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه شد و در 4 درجه سانتی‌گراد به مدت30 دقیقه نگهداری شد. سپس جذب در طول موج تحریکی 312 نانومتر و نشری 420 نانومتر توسط دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری شد(25).

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون (GSH)

این روش براساس تشکیل رنگ زرد در هنگام واکنش 5,50-dithiobis-2-Nitrobenzoic acid (DTNB) به‌عنوان شاخص با ترکیبات حاوی گروه‌های سولفیدریل است. به‌طور خلاصه، محتویات سلولی درون میکروتیوب‌ها را، از طریق سانتریفیوژ با TCA پروتونه می‌کنیم. پس از انکوباسیون، مایع رویی برای سنجش سطح GSH آنالیز می‌شود. سپس، 2/3 میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (0/2 مولار، PH 7/6) را به 0/2 میلی‌لیتر از مایع رویی سلولی و سپس، 0/5 میلی‌لیتر DTNB (0/001 مولار) را اضافه می‌کنیم. جذب محصولات (رنگ زرد ایجاد شده) پس از 5 دقیقه در طول موج 412 نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد(26).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)

0/25 میلی‌لیتر اسیدفسفریک (0/05 مولار) را به 0/2 میلی‌لیتر از نمونه با افزودن 0/3 میلی‌لیتر TBA 0/2درصد اضافه کردیم. تمامی نمونه‌ها را به مدت 30 دقیقه در حمام آب جوش قرارداده شد. در پایان، لوله‌ها به حمام یخ منتقل شد و 0/4 میلی‌لیتر n-بوتانول به هر لوله اضافه شد. سپس با سرعت 3500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار MDA تشکیل شده در هر یک از نمونه‌ها، از طریق اندازه‌گیری جذب مایع رویی در طول موج 532 نانومتر با دستگاه الایزاریدر ارزیابی شد. محتوای MDA به‌صورت µmol/mg protein بیان شد(27).

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

با استفاده از SOD assay kit شرکت نوند سلامت انجام شد(28).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

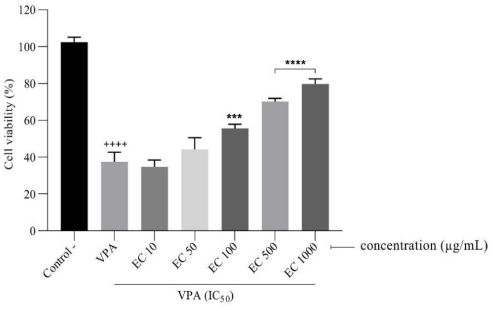
روش محاسبه IC_{50}

درصد سلول‌های زنده مانده از هر یک از رده‌های سلولی عصبی PC12 پس از مواجهه با والپروئیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت در نظرگرفته شد. زیرا یک ترکیب سایتوتوکسیک می‌باشد. بعد از انجام تست MTT با استفاده از نرم‌افزار Prism Ver. 8 محاسبه شد. P<0/05 به‌عنوان مبنای معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر حفاظتی اپی کاتچین بر زنده مانی سلول عصبی PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید (VPA) در تست MTT

همان‌طور که در نمودار شماره 1 نشان داده شده است، سلول‌های عصبی PC12 مواجه شده با VPA در غلظت IC_{50} باعث کاهش رشد شده است. با تیمار سلول‌های PC12 با اپی‌کاتچین در غلظت‌های از پیش تعیین شده، باعث مهار سمیت VPA و افزایش رشد سلول‌های نرمال شده است به‌طوری‌که این تأثیر وابسته به دوز بوده است.در مقایسه آماری با گروه کنترل مثبت مشخص شد که، غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌داری بودند که به‌ترتیب P<0/001 و P<0/0001 می‌باشد.

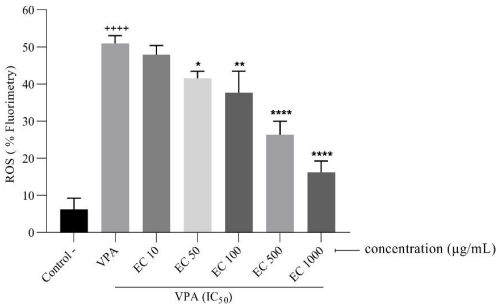


نمودار شماره 1: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500- 1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید(VPA) درغلظت IC_{50} بر رشد سلول‌های عصبی PC12

***P<0.001 EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
****P<0.0001 EC (500 and 1000 µg/mL)+VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
++++P<0.0001 VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

اثر حفاظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر سلول های PC12 با بررسی پارامتر ROS

در نمودار شماره 2 نشان داده شده است که VPA در غلظت IC_{50} باعث افزایش میزان ROS در سلول‌های عصبی شده است. از طرفی دیگر در تیمار سلول‌ها در غلظت‌های تعیین شده اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید میزان ROS به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. از نظر مقایسه آماری در غلظت‌های 500 و 1000 میکرو گرم بر میلی لیتر اپی‌کاتچین به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی داری با گروه والپروئیک اسید به تنهایی p <0/0001 نشان داده است.



نمودار شماره 2: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان استرس اکسیداتیو در سلول های عصبی PC12

*P<0.05 EC (50 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
**P<0.01 EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
****P<0.0001 EC (500 and 1000µg/mL)+VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
++++P<0.0001 VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

اثر حفاظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر ذخایر آنتی‌اکسیدانی GSH برسلول‌های PC12:

در نمودار شماره 3 نشان داده شده است بررسی محتویات گلوتاتیون در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی‌کاتچین به همراه والپروئیک اسید دارای اختلاف معنی‌داری با گروه VPA بودند که به ترتیب P <0/001 و P <0/0001 می‌باشد و درغلظت‌های 10 و 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

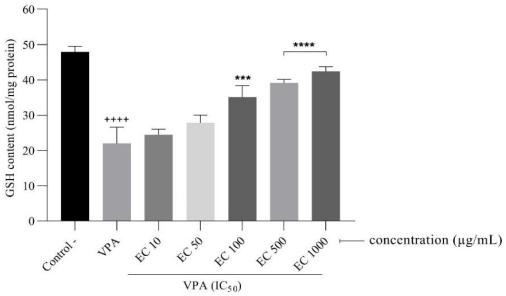
با گروه VPA به تنهایی دیده نشده است. هرچه غلظت اپی‌کاتچین بالاتر می‌رود، سطح GSH افزایش پیدا کرده که نشان‌دهنده‌ی اثر محافظتی اپی‌کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 می‌باشد.

اثر حفاظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر پراکسیداسیون لیپیدی MDA برسلول‌های PC12:

در نمودار شماره 4 در تست LPO از نظر مقایسه فاکتور کنترل‌کننده تست مالون دی الدئید محتویات MDA در غلظت 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی‌کاتچین به همراه والپروئیک اسید به ترتیب تفاوت معنی‌داری P<0/01، P<0/001 با گروه VPA به تنهایی دیده شده است. در غلظت‌های 10 و 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری دیده نشده است. با افزایش غلظت اپی‌کاتچین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی کاهش پیدا کرده و اثر محافظتی اپی‌کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 افزایش می‌یابد.

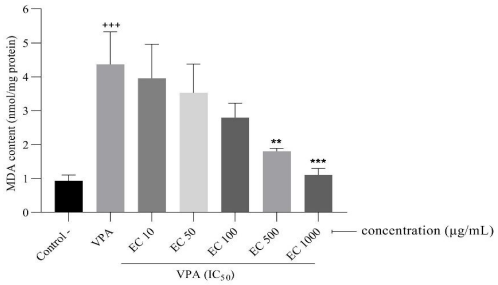
اثرات اپی کاتچین به‌همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر سلول‌های PC12:

در نمودار شماره 5 نشان داده شده است در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر *اپی‌کاتچین به‌همراه داروی والپروئیک اسید* دارای اختلاف معنی‌داری با گروه VPA بودند P<0/001 و P<0/0001. در غلظت‌های 100و 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی‌کاتچین به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری در افزایش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به ترتیب، P<0/01 و P<0/05 دیده شده است. در غلظت 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی‌کاتچین تفاوت معنی‌داری دیده نشده است. هرچه غلظت اپی‌کاتچین بالاتر می‌رود، سطح SOD افزایش می‌یابد که اثر محافظتی اپی‌کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 افزایش می‌یابد.



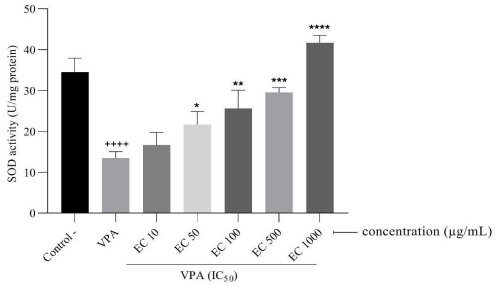
نمودار شماره 3: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان گلوتاتیون(GSH) در سلول‌های عصبی PC12

***P<0.001 EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
****P<0.0001 EC (500 and 1000 µg/mL)+VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
++++P<0.0001 VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;



نمودار شماره 4: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در سلول های عصبی PC12

**P<0.01 EC (500 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
***P<0.001 EC (1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
+++P<0.001 VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;



نمودار شماره 5: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان سوپراکسید دیسموتاز(SOD) در سلول های عصبیPC12

*P<0.05 EC (50 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
**P<0.01 EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
***P<0.001 EC (500 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
****P<0.0001 EC (1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
++++P<0.0001 VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات سایتوپروتکتیو و آنتی‌اکسیدانی اپی‌کاتچین بر سلول‌های مدل PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید بود. در این مطالعه، سلول‌های عصبی PC12 در غلظت IC_{50} به همراه اپی‌کاتچین در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) تریت شدند. میزان سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو بر روی این رده‌ی سلولی عصبی مورد بررسی قرار گرفت. طبق اطلاعات به دست آمده از نمودارها، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های در معرض والپروئیک اسید و گروه کنترل منفی مشاهده شد؛ که این امر در مطالعه‌ی ما، سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های عصبی PC12 را در مواجه با دوز IC_{50} والپروئیک اسید نشان می‌دهد.

مطالعات نقش استرس اکسیداتیو را در ارتباط با برخی بیماری‌ها مثل دیابت، سرطان، مالاریا، سندرم خستگی مزمن، آرتریت روماتوئید و بیماری‌های نورودژنراتیو مثل پارکینسون و آلزایمر نشان می‌دهد. مطالعات صورت گرفته با سنجش بیومارکرهایی مثل NOS، ROS و دفاع آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهدکه آسیب اکسیداتیو ممکن است در پاتوژنز این بیماری‌ها نقش داشته باشد(29). داروی ضد تشنج والپروات سدیم که برای درمان انواع مختلف صرع استفاده می‌شود، در انسان و حیوانات دارای اثرات تراتوژنیک شامل نقایص لوله‌ی عصبی و ناهنجاری‌های مادرزادی می‌باشد(29). مواد و داروهایی با آسیب به غشاهای سلولی نظیر جفت و سلول‌های در حال تمایز و تکثیر جنین، می‌توانند با ایجاد عدم تعادل بین دفاع آنتی‌اکسیدانی همانند آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و منابعی مثل گلوتاتیون و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، موجب ناهنجاری‌های جنینی مانند ناهنجاری‌های اسکلتی شوند. یکی از مکانیسم‌های تراتوژنی والپروئیک اسید، ایجاد رادیکال‌های آزاد و افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد(30). در مطالعه حاضر میزان سمیت والپروئیک اسید بر حیات رده‌های سلولی کاهش معنی‌داری در روند رشد سلول‌ها داشت، سلول‌های عصبی PC12 در مواجه با والپروئیک اسید رشدشان کاهش یافت که این بیانگر سمیت سلولی والپروئیک اسید است. مانند بیماری‌های نورودژنراتیو با از دست دادن پیش رونده تجمع سلول‌های عصبی ویژه توام با تجمع پروتئین‌ها می‌باشد. یک شکل شایع این بیماری‌ها آسیب اکسیداتیو نورون‌هاست که ممکن است مسئول اختلال عملکرد سلول عصبی یا مرگ سلول عصبی باشد که در پاتوژنز این بیماری‌ها نقش دارد(31).

در مطالعه دیگر Renno و همکاران نشان دادند که ترکیب پلی‌فنول اپی‌گالوکاتچین گالات چای سبز با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌تواند دربهبود آسیب عصب سیاتیک موش‌های صحرایی مؤثر باشد. آنان نشان دادند که تجویز اپی‌گالوکاتچین گالات به حیوانات باعث افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم می‌شود. علاوه بر این میزان فاکتور التهابی اینترلوکین-6 سرمی نیز در حیوانات تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین گالات کاهش یافته بود(32). در این رابطه He و همکاران در مطالعه‌ای در سال 2017 نشان دادند که پلی‌فنول اپی‌گالوکاتچین گالات چای سبز می‌تواند از نورون‌های کورتکس مغز موش‌های صحرایی در مقابل اثرات سمی آکریل آمید محافظت کند .آنان نشان دادند که تجویز اپی‌گالوکاتچین گالات باعث کاهش استرس اکسیداتیو و هم‌چنین کاهش آپوپتوز در نورون های کورتکس موش‌های صحرایی تیمار شده با آکریل آمید می‌شود(33). مطالعات نشان می‌دهند استفاده از آنتی‌اکسیدان بر روی موش‌های ترانس ژنیک موجب کاهش استرس اکسیداتیو و سطح الیگومر بتا آمیلوئید در مغز موش‌های مورد مطالعه می‌شود. بنابراین مطالعه اخیر نشان می‌دهد که نقش استرس اکسیداتیو و واکنش‌های التهابی در پیشرفت بیماری و اختلال حافظهٔ مربوط به آن بسیار مهم است(34). مطالعهٔ دیگری که توسط Hritcu و همکارانش بر روی مدل بیماری آلزایمر انجام گرفت، نشان داد که در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و سطح گلوتاتیون احیاء کاهش و میزان MDA افزایش یافته است(35). در طول سه دهه گذشته، چای سبز به خاطر مزایای سلامتی، به ویژه اثرات ضدسرطانی آن بسیار مورد توجه بوده است. پلی فنول اپی‌گالوکاتچین گالات موجود در چای سبز از اجزای اصلی فعال بیولوژیکی محسوب می‌شود که احتمالا در تولید آنزیم‌های مورد نیاز برای رشد سلول‌های سرطانی نقش ایفا می‌کند. علاوه بر این با سرکوب تشکیل عروق خونی در کنترل رشد تومورها موثر است(36). از این‌رو مطالعات انجام شده هم راستا با مطالعه حاضر می‌باشد. در این مطالعه نیز اپی‌کاتچین به عنوان ماده محافظتی و آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، با وجود این‌که هنوز در مورد نقش مؤثر استرس اکسیداتیو در برخی از بیماری‌های عصبی بحث وجود دارد، اما می‌توان در کنار انجام مطالعات بیش‌تر در مورد نقش استرس اکسیداتیو درپیماری‌زایی این بیماری‌ها، از درمان‌های آنتی اکسیدانی مانند اپی‌کاتچین به‌عنوان تعدیل‌کننده در این بیماری‌ها استفاده نمود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن اپی‌کاتچین به رده سلول‌های عصبی PC12 دریافت‌کننده والپروئیک اسید، به ترتیب بیش‌ترین تعداد سلول‌های زنده در دوزهای بالا (500 و 1000میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد و در دوزهای متوسط (50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) اختلاف آماری معنی‌داری $P<0/05$ به شکل وابسته به دوز مشاهده شد و منجر به کاهش سمیت سلولی والپروئیک اسید شد و حیات سلول های عصبی PC12 را افزایش داد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد والپروئیک اسید در دوز IC_{50} خود باعث ایجاد سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های عصبی PC12 می‌شود و اپی کاتچین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، با تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی (افزایش سطوح گلوتاتیون و سوپر اکسید دیسموتاز) و مهار رادیکال‌های آزاد، سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از والپروئیک اسید در سلول‌های عصبی PC12 را کاهش می‌دهد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد مصرف منابع اپی‌کاتچین، می‌تواند منجر به افزایش فعالیت و توان آنتی‌اکسیدانی شود و در پی آن باعث حفاظت سلول از آسیب ناشی از والپروئیک اسید در سلول‌های عصبی PC12 می‌شود. با درمان آنتی‌اکسیدانی مثل اپی‌کاتچین این امکان وجود دارد که بتوانیم شرایط اکسیداتیو را تنظیم نموده و بیماری‌ها را پیشگیری یا درمان نماییم.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر دارای تاییدیه کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق: IR.MAZUMS.RIB.REC.1400.033) می‌باشد.

References

1. Liampas I, Siokas V, Brotis A, Zintzaras E, Stefanidis I, Dardiotis E. Intravenous sodium valproate in status epilepticus: review and Meta-analysis. Int J Neurosci 2021; 131(1): 70-84.
2. Singh D, Gupta S, Verma I, Morsy MA, Nair AB, Ahmed A-SF. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. Biomed Pharmacother 2021; 142: 112021.
3. Aranarochana A, Sirichoat A, Pannangrong W, Wigmore P, Welbat JU. Melatonin ameliorates valproic acid-induced neurogenesis impairment: the role of oxidative stress in adult rats. Oxid Med Cell Longev 2021; 2021: 9997582.
4. Sina F, Vafaee Shahi M, Soheilipour F, Mohagheghi P, Riahi A, Borqei N, et al. Study the effect of sodium valproate on

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

weight, body mass index, uric acid, vitamin D3, blood insulin and serum lipid profile in children. RJMS 2021; 28(5): 49-59 (Persian).

5. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. BMC Med 2016; 14(1): 1-11.
6. Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status Curr Neuropharmacol 2014; 12(6): 527-550.
7. Das A, Sarwar MS, Hossain MS, Karmakar P, Islam MS, Hussain ME, et al. Elevated serum lipid peroxidation and reduced vitamin C and trace element concentrations are correlated with epilepsy. Clin EEG Neurosci 2019; 50(1): 63-72.
8. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Ebrahimizadeh MH, Ahmadi Moghaddam K, Goodarzi G, Ghasemi Hamidabadi H. Evaluation proliferative effect of nettle leaf extract on neural stem cell in oxidative stress condition. Journal of Cell & Tissue 2018; 9(4): 333-343.
9. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Curr Opin Food Sci 2016; 8: 33-42.
10. Narmada IB, Sarasati A, Wicaksono S, Rezkita F, Wibawa KGP, Hayaza S. Phytochemical screening, antioxidant activity, functional groups and chemical element characterization analysis of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in East Javanese Green Tea methanolic extract: an experimental in vitro study. Sys Rev Pharm 2020; 11(5): 511-519.
11. Zhang Y, Lin H, Liu C, Huang J, Liu Z. A review for physiological activities of EGCG and the role in improving fertility in humans/ mammals. Biomed Pharmacother 2020; 127: 110186.
12. Tang G, Xu Y, Zhang C, Wang N, Li H, Feng Y. Green tea and epigallocatechin gallate (EGCG) for the management of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD): Insights into the role of oxidative stress and antioxidant mechanism. Antioxidants 2021; 10(7): 1076.
13. Truong V-L, Jeong W-S. Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases. Food Sci Hum Wellness 2022; 11(3): 502-511.
14. Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. Molecules 2018; 23(4): 965.
15. Ide K, Matsuoka N, Yamada H, Furushima D, Kawakami K. Effects of tea catechins on Alzheimer's disease: Recent updates and perspectives. Molecules 2018; 23(9): 2357.
16. Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF-κβ: a potential target in the management of vascular complications of diabetes. Front Pharmacol 2017; 8: 798.
17. He J, Xu L, Yang L, Wang X. Epigallocatechin gallate is the most effective catechin against antioxidant stress via hydrogen peroxide and radical scavenging activity. Med Sci Monit 2018; 24: 8198-8206.
18. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. Nat Rev Drug Discov 2021; 20(9): 689-709.
19. Delavar MR, Baghi M, Safaeinejad Z, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Differential expression of miR-34a, miR-141, and miR-9 in MPP+-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. Gene 2018; 662: 54-65.
20. Zhang J, An S, Hu W, Teng M, Wang X, Qu Y, et al. The neuroprotective properties of

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

Hericium erinaceus in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model. Int J Mol Sci 2016; 17(11): 1810.

21. Ghorbani E, Bakhshi D, Ghasemnezhad M, Arakawa O, Hajnajari H, Papachatzis A, editors. Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity of some native and imported apple cultivars in Iran. ISHS Acta Horticulturae 981: II Balkan Symposium on Fruit Growing. 2011.
22. Miliauskas G, Venskutonis P, Van Beek T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 2004; 85(2): 231-237.
23. Arab-Nozari M, Mohammadi E, Shokrzadeh M, Ahangar N, Amiri FT, Shaki F. Co-exposure to non-toxic levels of cadmium and fluoride induces hepatotoxicity in rats via triggering mitochondrial oxidative damage, apoptosis, and NF-kB pathways. Environ Sci Pollut Res Int 2020; 27: 24048-24058.
24. Kuhestani S, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh S. Protective Effects of Simvastatin on Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Gingival Fibroblasts Cells Exposed to Venlafaxine. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31(205): 81-88 (Persian).
25. Shokrzadeh M, Ghassemi-Barghi N. Melatonin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Application in attenuating etoposide-induced genotoxicity in HepG2 cells. Pharmacology 2018; 102(1-2): 74-80.
26. Dong Y, Hou Q, Lei J, Wolf PG, Ayansola H, Zhang B. Quercetin alleviates intestinal oxidative damage induced by H2O2 via modulation of GSH: in vitro screening and in vivo evaluation in a colitis model of mice. ACS Omega 2020; 5(14): 8334-8346.
27. Islam S. In Vitro Antioxidant And Toxicological Evaluation Of Herbal Health Supplements, Claimed As Antioxidant Boosters, From Local Markets Of Lahore, Pakistan. Pak J Sci 2021; 73(1): 96.
28. Azari A, Shokrzadeh M, Zamani E, Amani N, Shaki F. Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. Drug Chem Toxicol 2019; 42(1): 54-59.
29. Manthou ME, Meditskou S, Lykartsis C, Sapalidis K, Sorkou K, Emmanouil-Nikoloussi E-N. The role of neuronal apoptosis in Valproic Acid brain-related teratogenesis: A histochemical and immunohistochemical study in BALB/c mice. Rom J Morphol Embryol 2020; 61(3): 813.
30. Lloyd KA. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. Int J Stud Res 2013; 6.
31. Castelli V, Benedetti E, Antonosante A, Catanesi M, Pitari G, Ippoliti R, et al. Neuronal cells rearrangement during aging and neurodegenerative disease: metabolism, oxidative stress and organelles dynamic. Front Mol Neurosci 2019; 12: 132.
32. Renno WM, Benov L, Khan KM. Possible role of antioxidative capacity of (−)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. J Neurosurg Spine 2017; 27(5): 593-613.
33. He Y, Tan D, Bai B, Wu Z, Ji S. Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex. Toxicol Mech Methods 2017; 27(4): 298-306.
34. Wang S-w, Yang S-g, Liu W, Zhang Y-x, Xu P-x, Wang T, et al. Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]

beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. Behav Brain Res 2016; 296: 109-117.

35. Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. Neurosci Lett 2015; 591: 41-47.
36. Cheng Z, Zhang Z, Han Y, Wang J, Wang Y, Chen X, et al. A review on anti-cancer effect of green tea catechins. JFF 2020; 74: 104172.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-11-21]